

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

¥8.08.00

#2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月19日

RECD 05 OCT 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第233262号

出 願 人

Applicant(s):

昭和産業株式会社

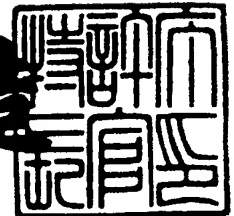
4

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3075957

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P199S02082  
【提出日】 平成11年 8月19日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12P 19/00

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県静岡市小鹿 1 7 3 9 - 7

【氏名】 碓氷 泰市

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県静岡市小鹿 3 - 3 - 2 - 1 0 - 1 5

【氏名】 村田 健臣

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県静岡市小鹿 9 1 3 - 3 2 0 8 号

【氏名】 戸谷 英一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市桜 1 丁目 1 6 番地 昭和産業株式会社  
総合研究所 バイオ研究センター内

【氏名】 安武 望

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市桜 1 丁目 1 6 番地 昭和産業株式会社総  
合研究所 バイオ研究センター内

【氏名】 三吉 新介

【特許出願人】

【識別番号】 000187079

【氏名又は名称】 昭和産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100104673

【弁理士】

【氏名又は名称】 南條 博道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050740

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

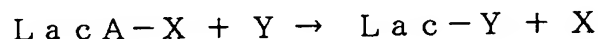
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 配糖体の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】  $\beta$  1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



(式中、LacAはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素(H)、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性またはフェノール性水酸基を有する化合物をそれぞれ表す。)で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法。

【請求項2】 Yがアルコール性水酸基を有する化合物である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】 Yがセラミドまたはセラミド類縁体である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項4】 Yがフェノール性水酸基を有する化合物である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項5】 Yが水酸基を有するフラボノイド類縁化合物である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項6】 Yがセリンまたはスレオニン残基を有するアミノ酸、ペプチドまたは蛋白質である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項7】 Xが水素である、請求項1ないし6いずれかの項に記載の製造方法。

【請求項8】 前記 $\beta$ -1, 4 グルコシル結合を切断する活性を有する酵素が、エキソセロビオヒドロラーゼ、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ、および/またはセルラーゼである、請求項1ないし7いずれかの項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。さらに詳しくは、 $\beta$ -1, 4 グルコシル結合を切断する活性を有する酵素を用いるラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

糖質および複合糖質（糖蛋白質、糖脂質、配糖体など）は、生物細胞、体液、果実、種子など動・植物に存在し、細胞膜表面における生体情報の伝達、細胞の形態形成、蛋白質との共有結合による高次構造の維持など、遺伝子や蛋白質と同様に生体機能の維持・調節に不可欠な機能を担っていることが明らかにされてきている。

## 【0003】

このような糖質および複合糖質の機能をさらに向上させ、あるいはその生理機能を改変して、医療、食品などの用途に利用すべく、糖鎖および複合糖質の修飾・置換研究（リモデリング）が行われている。

## 【0004】

糖質および複合糖質の糖鎖のリモデリングの方法には、化学的な方法と酵素的な方法、および双方を組み合わせた方法がある。

## 【0005】

化学的な方法として有機合成法による糖鎖合成があるが、この方法は操作が煩雑である上、副生産物の除去（目的物質の精製）工程が必要となる。さらに、人体に有害な試薬を用いることが多く、廃液による周辺環境への影響が危惧されるという問題点がある。

## 【0006】

他方、糖鎖を酵素的にリモデリングする方法としては、転移酵素またはエキソグリコシダーゼを用いる方法、エンドグリコシダーゼを用いる方法などが知られている。

## 【0007】

転移酵素またはエキソグリコシダーゼを用いる方法として、D. H. ジョジアッセ (D. H. Joziassse) ら Eur. J. Biochem., 第191巻、第75～83頁 (1990) には、エキソグリコシダーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼを用いて、糖鎖の非還元末端にグリコシル基を逐次添加していく方法が記載されている。

#### 【0008】

しかし、エキソグリコシダーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼを用いた糖鎖合成は、化学的合成に比べると容易であるが、それでも糖残基一つ一つについてその酵素反応を逐次的に行う必要があるので、多数の反応ステップを行う必要があり、煩雑であるという問題がある。

#### 【0009】

エンドグルコシダーゼを用いる糖転移反応として、R. B. トリムブル (R. B. Trimble) ら J. Biol. Chem., 第261巻、第12000～12005頁 (1986) には、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) 由来のエンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いる方法が記載されている。R. M. バーデールス (R. M. Bardales) ら J. Biol. Chem., 第264巻、第19893～19897頁 (1989) にはディプロコッカス・ニューモニエ (*Diplococcus pneumoniae*) 由来のエンド- $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼを用いる方法が記載されている。さらに、特開平5-64594号公報には、アルスロバクター・プロトホルミエ (*Arthrobacter protophormiae*) 由来のエンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖質への高マンノース型糖鎖の転移反応が記載されている。また、K. ヤマモト (K. Yamamoto) ら Biochem. Biophys. Res. Commun., 第203巻、第244～252頁 (1994) にはムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*) 由来のエンド- $\beta$ -アセチルグルコサミニダーゼによる糖質への糖鎖転移反応が記載されている。さらに、特開平10-245402号公報には、エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた (Man) 6-GlcNAcの転移反応が記載され、特開平10-33194号公報には、ラクト-N-ビオシダーゼを用いた Gal  $\beta$  1-3GlcNAcの転移反応が記載されている。

## 【0010】

このように、エンドグルコシダーゼで様々な糖鎖を転移する例が報告されているが、ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを転移させた例はこれまでに報告されていない。

## 【0011】

ところで、ラクトース構造は、様々なスフィンゴ糖脂質の基本骨格となっている。スフィンゴ糖脂質は、大部分が動物組織に存在し、その基本糖鎖の構造によってグロボ系、ラクト系、ガングリオ系、ガラ系のおおよそ4つの系列に大別される。このうち、グロボ系、ラクト系、ガングリオ系の3つは、セラミドにラクトースが結合したラクトシルセラミドを基本骨格としており、つぎに付加される糖質によって分類されている。

## 【0012】

このラクトシルセラミドは、Gal $\beta$ 1-4Glcユニット、すなわちラクトースユニットを有しているが、細菌が複合糖質の配列を認識する際、このラクトースユニットを認識することが知られるようになり、微生物が宿主細胞に糖鎖を介して接着するというメカニズムは、細胞と細胞の認識作用のモデルとして重要な役割を示している。さらに、細菌は細胞表面にある糖鎖の末端部分だけを認識して結合するだけではなく、糖鎖内部にある糖鎖構造を認識することがわかってきた。例：大腸菌、シュードモナス属菌、放線菌、プロピオン酸菌は糖鎖の内部にあるラクトース構造も認識することが知られている。

## 【0013】

このように、このラクトシルセラミドは、細胞の接着などの生理学的に重要な機能を担っている。従って、ラクトシル配糖体は、医療、食品などの用途に利用できるが、その製造が容易ではないのが実状である。

## 【0014】

また、N-アセチルラクトサミニル配糖体は、ブドウ状球菌が認識するレセプター、あるいはインフルエンザウイルスAおよびB、センダイウイルス、ニューカッスル病ウイルスなどが認識する糖鎖構造のコア部分に存在することが知られており、細胞の認識に関与するので、医療用途に有用であるが、その製造が容易

ではないのが実状である。

【0015】

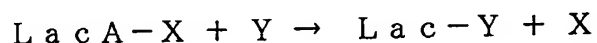
【発明が解決しようとする課題】

従って、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の簡便な製造方法が望まれている。

【0016】

【課題を解決するための手段】

本発明は、 $\beta$ 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



【0017】

(式中、LacAはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素(H)、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性、またはフェノール性水酸基を有する化合物、もしくは水酸基を有するフラボノイド類縁化合物をそれぞれ表す。)で表わされるラクトース転移反応を用いることを特徴とするラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。

【0018】

好ましい実施態様においては、前記Yがアルコール性水酸基を有する化合物である。

【0019】

好ましい実施態様においては、前記Yがセラミドまたはセラミド類縁体である。

【0020】

また、好ましい実施態様においては、Yがフェノール性水酸基を有する化合物である。

【0021】

また、好ましい実施態様においては、Yが水酸基を有するフラボノイド類縁化合物である。



## 【0022】

また、好ましい実施態様においては、Yがセリンもしくはスレオニンまたはこれらの残基を有するペプチドまたは蛋白質である。

## 【0023】

また、好ましい実施態様においては、Xが水素である。

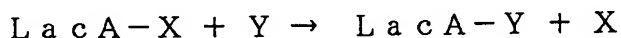
## 【0024】

好ましい実施態様においては、前記 $\beta-1, 4$ グルコシル結合を切断する活性を有する酵素が、エキソセロビオヒドロラーゼ、 $\beta-D$ -グルコシダーゼ、またはセルラーゼである。

## 【0025】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、 $\beta 1, 4$ グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはラクトサミニル配糖体の製造方法である。

## 【0026】

## (酵素)

本発明に用いられる酵素は、 $\beta 1, 4$ グルコシル結合切断活性を有する酵素であれば、特に制限がない。エンド型の酵素でもよく、エキソ型の酵素でもよい。好ましい酵素としては、エキソセロビオヒドロラーゼ、 $\beta-D$ -グルコシダーゼ、セルラーゼなどが挙げられる。これらの酵素は、単独で用いてもよく、混合して用いてもよい。

## 【0027】

酵素は、市販の $\beta 1, 4$ グルコシル結合切断活性を有する酵素であってもよく、 $\beta 1, 4$ グルコシル結合切断活性を有する酵素を生産する微生物、その培養液あるいは抽出物、あるいは精製物であってもよい。 $\beta 1, 4$ グルコシル結合切断活性を有する酵素を生産する微生物は、公知である。

## 【0028】

細菌の例としては、例えば、バシラス (*Bacillus*) 属、セルビブリオ (*Cellvibrio*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、スポロサイトファーガ (*Sporocytophaga*) 属、アセティビブリオ (*Acetivibrio*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、バクテリオイド (*Bacterioides*) 属、トレポネマ (*Treponema*) 属、ルミノコッカス (*Ruminococcus*) 属などが挙げられる。

## 【0029】

糸状菌の例としては、例えば、フミコーラ (*Humicola*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、マイロセシウム (*Myrothecium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、イルペクス (*Irpex*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、ペリクラリラ (*Pellicularia*) 属などに属する微生物が挙げられる。

## 【0030】

放線菌の例としては、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、サーモノスポラ (*Thermomonospora*) 属に属する微生物が挙げられる。

## 【0031】

(供与体)

一般式  $LacA-X$  で表されるラクトースまたはN-アセチルラクトサミン供与体としては、ラクトース又はN-アセチルラクトサミン (Xが水素の場合) 及び、ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを含有する糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物が挙げられる。

## 【0032】

ラクトース供与体及び／又はN-アセチルラクトサミン供与体の糖質としては、ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンが $\beta$ -グルコシド結合したオリゴ糖が挙げられる。

## 【0033】

ラクトース供与体及び／又は、N-アセチルラクトサミン供与体の複合糖質としては、ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを末端に有する糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質が挙げられる。糖脂質としては、スフィンゴ糖脂質が好

ましく、スフィンゴ糖脂質の構成成分であるセラミドあるいはセラミド類縁体の末端にラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを有するものが好ましく用いられる。

#### 【0034】

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミン供与体のフェノール性化合物としては、特に制限がない。ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを有するフェノールおよびその誘導体（例えば、パラニトロフェノール）、チロシンおよびその誘導体、サリチル酸およびその誘導体などが挙げられる。

#### 【0035】

##### （受容体）

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体であるYとしては、アルコール性またはフェノール性水酸基を有する化合物、または水酸基を有するフラボノイド類縁体が挙げられる。

#### 【0036】

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体であるアルコール性水酸基を有する化合物としては、例えば、アルコール、アミノ酸、糖質、複合糖質、複合脂質などが挙げられる。アルコール性水酸基としては一級、二級、三級アルコール性水酸基でもよく、これらのアルコール性水酸基を有する化合物が用いられる。

#### 【0037】

一級アルコールとしては、エタノール、ブタノール、プロパノール、ヘキサノール（シス-3-ヘキサノール）、オクタノール、ゲラニオール、シトロネロール、ネロールなどの飽和、不飽和の脂肪族アルコール、フェネチルアルコール、ベンジルアルコール、シンナミルアルコール、アニスアルコールなどの芳香族アルコール、メントール、サンタロールなどの脂環族アルコールが挙げられる。二級アルコールとしては、イソプロパノール、sec-ブタノールなどが挙げられる。

#### 【0038】

三級アルコールとしては、t-ブチルアルコールなどが挙げられる。

【0039】

また、アルコール性水酸基を有するアミノ酸としては、例えば、セリン、スレオニンなどが挙げられる。さらに、アルコール性水酸基を有するアミノ酸、例えば、セリン、スレオニン残基を含有するペプチドおよび蛋白質、あるいは後述のフェノール性水酸基を有するチロシンを含有するペプチドも本発明の受容体として用いられる。

【0040】

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体である糖質としては、グルコース、マンノースなどの単糖が挙げられる。オリゴ糖としては、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、サイクロデキストリン、ゲンチオオリゴ糖、ニゲロオリゴ糖などの澱粉関連のオリゴ糖、マルトオリゴシルスクロース、フラクトオリゴ糖、バラチノース、ラクトスクロース、キシロシルフルクトシド、ラフィノース、スタキオースなどの砂糖関連のオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ラクチュロースなどの乳糖関連のオリゴ糖、キシロオリゴ糖、アガロオリゴ糖、キチン・キトサンオリゴ糖、マンノオリゴ糖、アルギン酸オリゴ糖などが挙げられる。また、糖蛋白質、糖脂質の構成成分となっている糖鎖もしくはその部分構造となる糖鎖などを挙げるができる。

【0041】

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体である複合糖質としては、糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質が挙げられる。糖脂質としては、例えば、スフィンゴ糖脂質が好ましく用いられる。

【0042】

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体である複合脂質としては、スフィンゴ糖脂質の構成成分であるセラミドあるいはセラミド類縁体が好ましく用いられる。

【0043】

フェノール性水酸基を有する化合物としては、フェノールおよびその誘導体、チロシンおよびその誘導体、サリチル酸およびその誘導体などが挙げられる。

【0044】

水酸基を有するフラボノイド類縁体としては、フラボノール、フラバノールなどが挙げられる。

## 【0045】

(ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル転移反応)

ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル転移反応には、特に制限はない。ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル供与体と、 $\beta$ -1, 4 グルコシル結合を切断する活性を有する酵素と、ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル受容体とを適切な割合で混合し、反応させればよい。

## 【0046】

転移反応におけるラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル供与体および受容体の濃度は、特に制限はなく、当業者が反応の効率などを考慮して適宜決定すればよい。

## 【0047】

用いる酵素の濃度は、特に制限がない。基質の濃度、反応温度、反応時間などを考慮して、当業者が決定すればよい。例えば、予備試験を行って、用いる酵素量を決定することができる。

## 【0048】

反応温度は特に制限はない。一般的には、用いる酵素の至適温度 $\pm 20^{\circ}\text{C}$ 程度の範囲で行われる。より好ましくは酵素の至適温度 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ 程度の範囲で行われる。

## 【0049】

反応のpHも特に制限がなく、用いる酵素によっても異なるが、一般には用いる酵素の至適pH $\pm 3$ 程度の範囲で行われる。より好ましくは酵素の至適pH $\pm 2$ 程度の範囲で行われる。このようなpH調整には、当業者が用いる適切な緩衝液が用いられる。

## 【0050】

なお、基質が水に溶解しにくい場合、基質を溶解するために少量の溶媒を加えても良い。

## 【0051】

### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

#### 【0052】

##### (実施例1)

アルコールを受容体とするラクトシル転移反応を行った。ラクトース供与体として、p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ラクトシド（以下、Lac-pNPという）を、ラクトース受容体として、アルコールであるエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、2-プロパノールおよびt-ブチルアルコールを用いた。酵素として、トリコデルマ・リーゼイ（*T. reesei*）由来のセルラーゼ（協和発酵製）を用いた。

#### 【0053】

10mg/mlの酵素溶液50 $\mu$ l（20mM酢酸緩衝液（pH5.0）に溶解）に、4.65mg/mlのLac-pNPを200 $\mu$ l、各種アルコールを120 $\mu$ l、0.2M酢酸緩衝液（pH5.5）を30 $\mu$ l加え、全量を400 $\mu$ lとした。酵素反応は40℃で行い、転移反応は経時的に薄層クロマトグラフィー（以下、TLCという：展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水=60：35：8）で確認した。TLCはメルク社製のアルミニウムシートシリカゲル60/Kieselgur F254プレコートを用いた。検出は、オルシン-硫酸による発色で行った。

#### 【0054】

結果を図1に示す。図中、Rはラクトース（Lac）とLac-pNPの混合液を表し、ラクトースのR<sub>f</sub>値（0.13）はLac-pNPのR<sub>f</sub>値（0.43）より小さい。また、Sは反応液を、Bはブランクを意味する。なお、ブランクは、酵素の代わりに水を添加して反応させたものである。図1において、(1)はエタノール、(2)はブタノール、(3)はヘキサノール、(4)はオクタノール、(5)は2-プロパノールおよび(6)はt-ブチルアルコールを基質としたときの結果である。

#### 【0055】

(1)～(6)のすべての反応液S中に、反応初期には存在しなかったラクトース (Lac) が生成され、さらに(1)～(6)のそれぞれのアルコールに対応するアルキルラクトシド (それぞれ、エチルラクトシド、ブチルラクトシド、ヘキシルラクトシド、オクチルラクトシド、2-プロピルラクトシド、および $\gamma$ -ブチルラクトシド) が生成していた。即ち、(1)～(6)のすべての反応液で、Lac-pNP ラクトースがアルコールに転移されて、アルキルラクトシドが生成していることが確認された。なお、(2)のブチルラクトシドのR<sub>f</sub>値 (0.38) と(6)の $\gamma$ -ブチルラクトシドのR<sub>f</sub>値 (0.45) は、Lac-pNPのR<sub>f</sub>値 (0.43) と近かったので、図1のTLCにおいて、(2)と(6)とは、一見、Lac-pNPと区別がされにくかった。

## 【0056】

## (実施例2)

実施例1のエタノールをラクトース受容体としたもの(1))について、反応生成物を解析した。27時間反応させた後、100℃、10分加熱し、17,000rpm、10分の遠心分離処理を行い、上清を得た。上清をエバポレートして乾固し、10mlの25%メタノール水溶液に溶解した。溶解液をトヨパールHW-40Sゲル濾過カラムクロマトグラフィー ( $\phi$  2.5mm×80cm) にロードし、25%メタノール水溶液を溶媒として、流速1.0ml/分で、10mlづつ、分画した。検出は、フェノール-硫酸法による発色を、210nm、300nm、485nmで測定した。チューブNo. 34～44の画分をプールし、エバポレートして乾固した。

## 【0057】

乾固物を10mlのクロロホルム：メタノール：水=50：45：10に溶解し、ワコーゲルC-300を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離・精製した。クロロホルム：メタノール：水=50：45：10を展開溶媒とし、流速2.0ml/分で展開し、10mlづつ、分画した。検出は、フェノール-硫酸法による発色を、210nm、300nm、485nmで測定した。チューブNo. 11～13の画分をプールし、エバポレートして乾固した。

## 【0058】

得られた乾固物の一部を0.3 mlの蒸留水に溶解して、質量分析FAB/MSを行い、他方で、得られた乾固物の一部を重水に溶解して、 $^1\text{H}$ -NMR分析を行った。 $^1\text{H}$ -NMRの結果を図2に、FAB/MSの結果を図3に示す。構造解析の結果、(1)の生成物がエチルラクトシドであることが確認された。

【0059】

(実施例3)

アルコール性水酸基を有するセリン、スレオニンへのラクトースの転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例1と同じものを使用した。反応液として、酵素を0.5 mg、Lac-pNPを0.94 mg、セリンを50 mgまたはスレオニンを15 mg含む、15 mM酢酸緩衝液(pH 5.0) 400  $\mu\text{l}$ を調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図4に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=50：45：10であった。

【0060】

図4において、R、SおよびBは、前記の通りである。(7)はセリン、(8)はスレオニンを受容体としたときの結果である。(7)および(8)の反応液において、基質Lac-pNPは消滅し、それぞれ、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドとが生じていた。なお、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドのR<sub>f</sub>値はそれぞれ、0.27、0.29であり、ラクトースのR<sub>f</sub>値(0.34)と近いために、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドはラクトースから明確に分離されず、ブロードなバンドとして表れた。

【0061】

(実施例4)

ラクトースのアルコール性水酸基を有する単糖への転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例1と同じものを使用した。反応液として、酵素を0.5 mg、Lac-pNPを0.94 mg、グルコースまたはマンノースをそれぞれ70 mg含む、15 mM酢酸緩衝液(pH 5.0) 400  $\mu\text{l}$ を調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図5に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=50



: 45 : 10であった。

【0062】

図5において、R、SおよびBは、前記の通りである。(9)はグルコース、(10)はマンノースを受容体としたときの結果である。(9)および(10)の反応液において、基質Lac-pNPは消滅し、それぞれ、グルコシルラクトシドとマンノシルラクトシドとが生じていた。グルコシルラクトシドとマンノシルラクトシドのRf値はそれぞれ、0.24、0.25であり、ラクトースのRf値(0.34)よりも小さいRf値を有しており、ラクトースから明確に分離された。

【0063】

なお、図5において、Lac-pNPとLacの間にバンドがあるが、(9)はグルコース(Glu)、(10)はマンノース(Man)であった。

【0064】

(実施例5)

ラクトースのL-メントールへの転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例1と同じものを使用した。反応液として、酵素を1mg、Lac-pNPを1mg、L-メントールを5mg、および界面活性剤として、コール酸を2重量%含む、15mM酢酸緩衝液(pH5.0)400 $\mu$ lを調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図6に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=65：35：4であった。

【0065】

図6において、R、SおよびBは、前記の通りである。基質Lac-pNPは消滅し、L-メントリルラクトシドが生じており(Rf値0.62)、ラクトース(Rf値0.13)と区別された。L-メントリルラクトシド以外のスポットは、Rf値0.81のコール酸以外は、なんらかの反応生成物と考えられる。

【0066】

(実施例6)

N-アセチルラクトサミン供与体として、p-ニトロフェニル- $\beta$ -N-アセチルラクトサミン(以下、LacNAc-pNPという)を用いた。反応液とし

て、0.94 mg、N-アセチルラクトサミン受容体としてエタノール120  $\mu$ l、酵素として、トリコデルマ・リーゼイ (T. reesei) 由来のセルラーゼ（協和発酵製）を0.5 mgを含む400  $\mu$ lの15 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）を調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図7に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水＝50：40：50であった。

#### 【0067】

図7において、R、SおよびBは、前記の通りである。基質LacNAc-pNPは消滅し、エチルN-アセチルラクトサミニドが生じており（Rf値0.46）、N-アセチルラクトサミン（Rf値0.30）、およびLacNAc-pNP（Rf値0.56）と区別された。

#### 【0068】

##### （実施例8）

ラクトースを供与体とし、エタノールを受容体として、エチルラクトシドを合成した。ラクトース400 mg、エタノール100  $\mu$ l、酵素としてトリコデルマ・リーゼイ由来のセルラーゼ（協和発酵製）を3 mg含む1000  $\mu$ lの100 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）を調製し、40℃、48時間反応した。反応後、実施例1と同様に、TLCを用いて分析した。展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水＝60：35：8であった。結果を図8に示す。TLCではいくつかのスポットが見られたが、エチルラクトシドと同じRf値を有するスポットが生成していた。なお、図8中、Cはエチルラクトシドのみを含むコントロールを意味する。

#### 【0069】

この結果は、 $\beta$ -1,4グルコシル結合を切断する酵素の存在下、ラクトース自体がアルコールと縮合し得ることを示している。

#### 【0070】

##### 【発明の効果】

本発明により、食品、機能性食品素材、医薬品および試薬として有用なラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体が、温和な条件で、しかも

高収率で大量に製造され、安価に供給することが可能となる。また、本発明によるラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体は、医学、生化学の研究に貢献するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Lac-pNPからのラクトースのアルコールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【図2】 エチルラクトシドの $^1\text{H}$ -NMRである。

【図3】 エチルラクトシドの質量分析スペクトルである。

【図4】 Lac-pNPからのラクトースの、セリンおよびスレオニンへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【図5】 Lac-pNPからのラクトースの単糖への転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

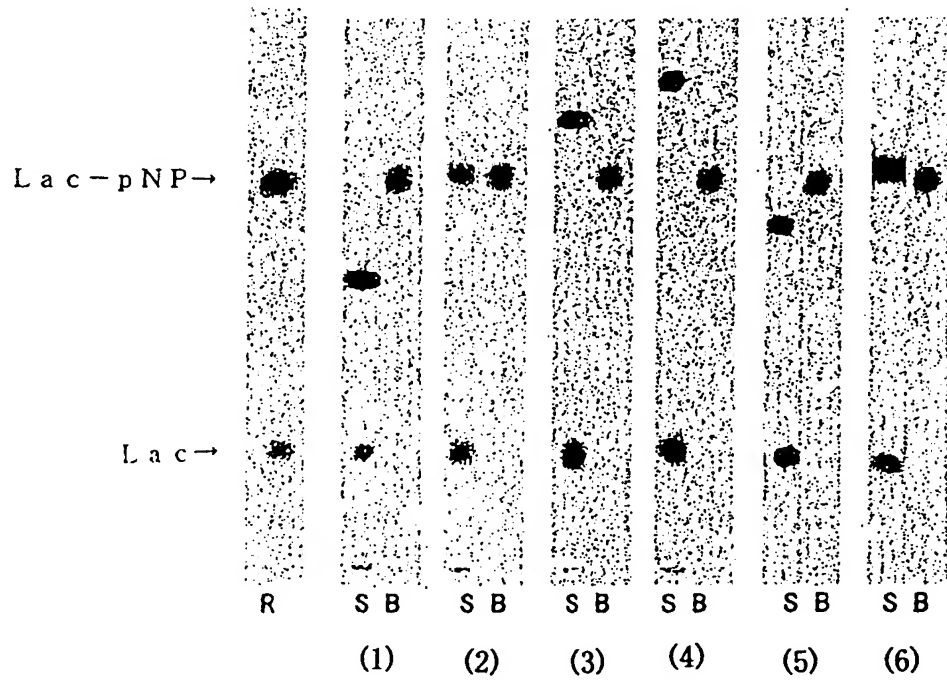
【図6】 Lac-pNPからのラクトースのL-メントールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【図7】 LacNAc-pNPからのN-アセチルラクトサミンのアルコールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

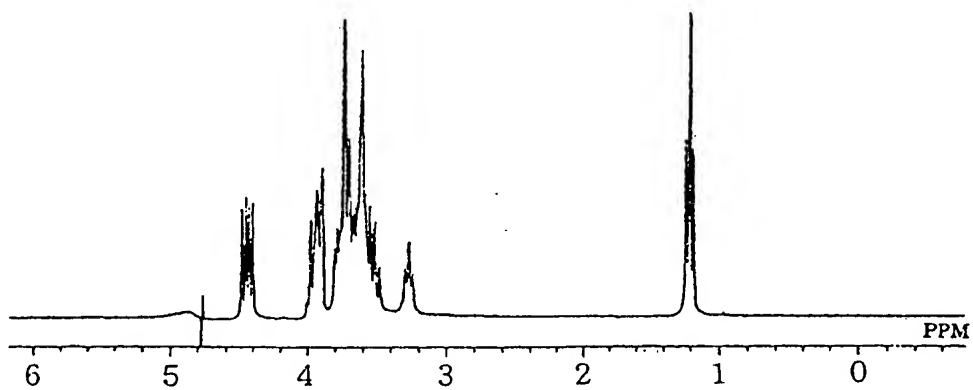
【図8】 ラクトースのアルコールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

【書類名】 図面

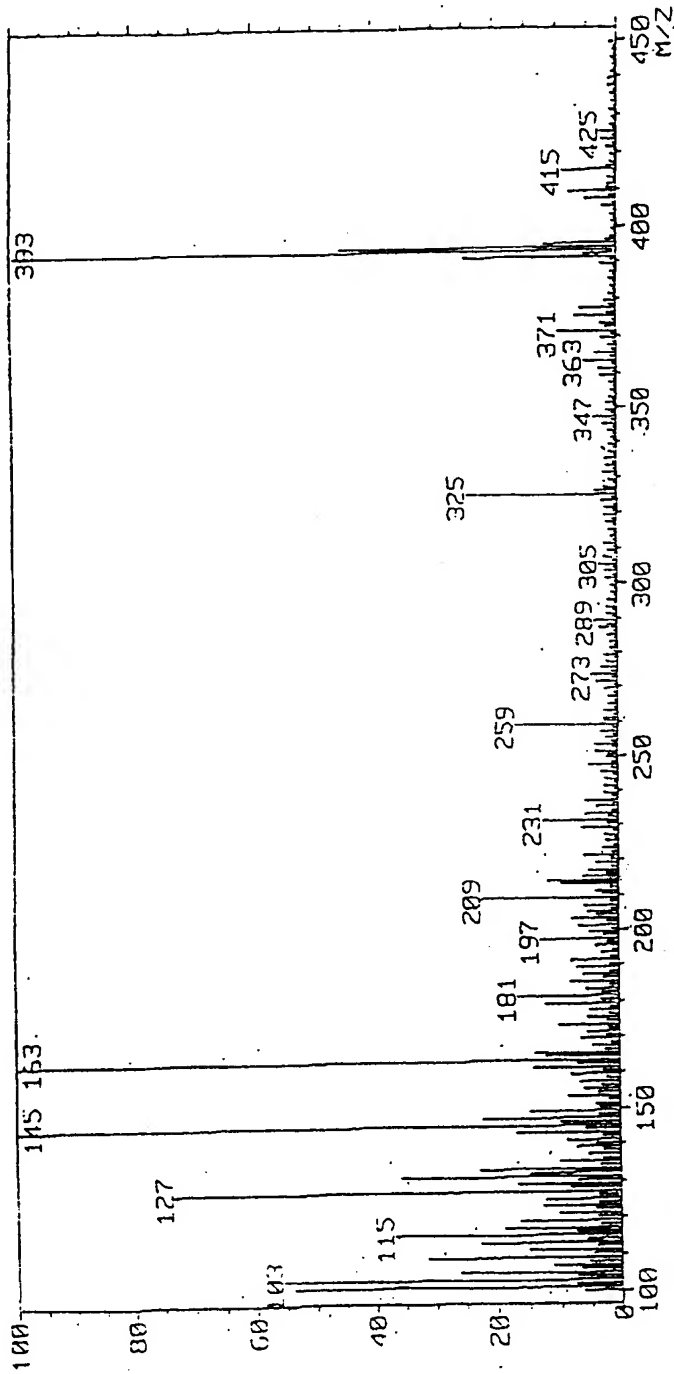
【図 1】



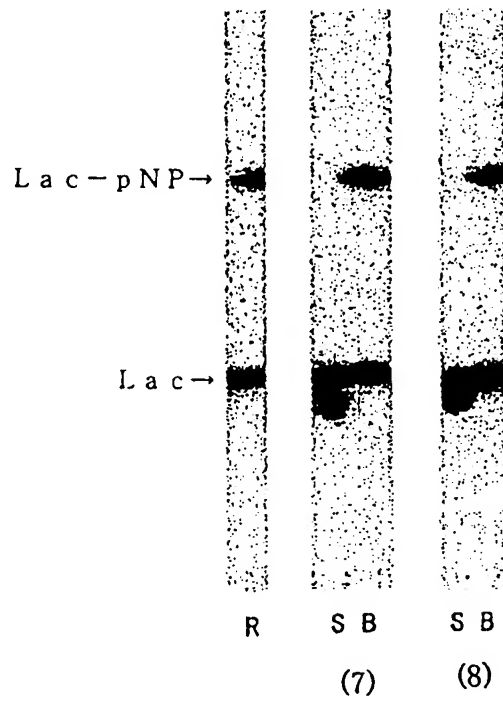
【図 2】



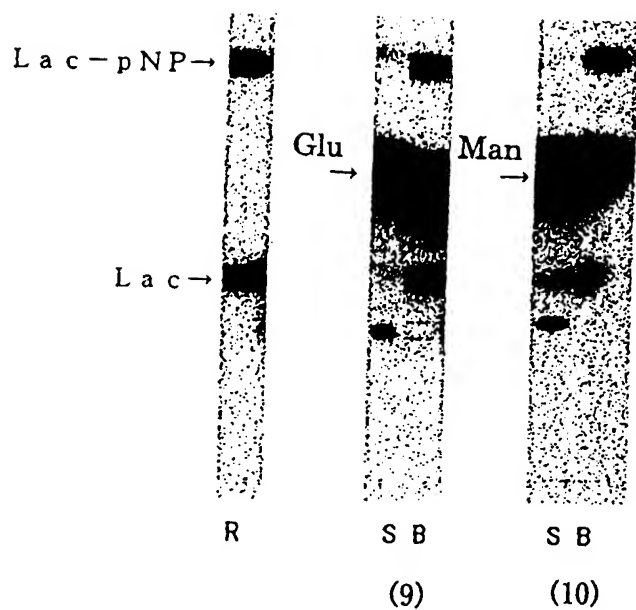
【图 3】



【図 4】

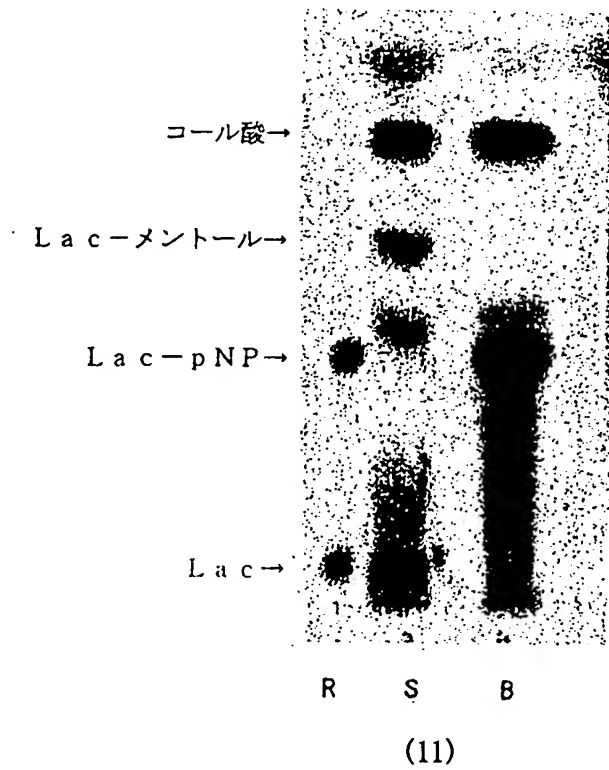


【図 5】

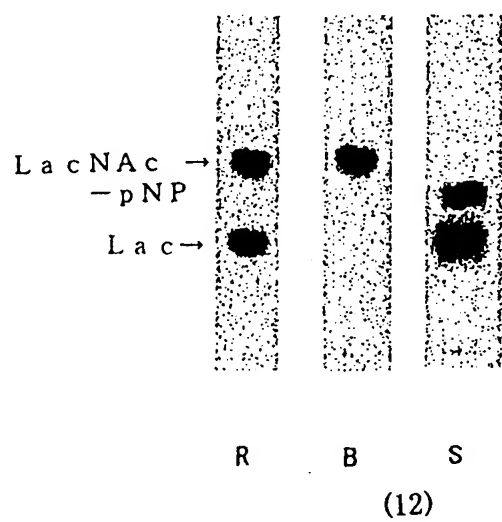




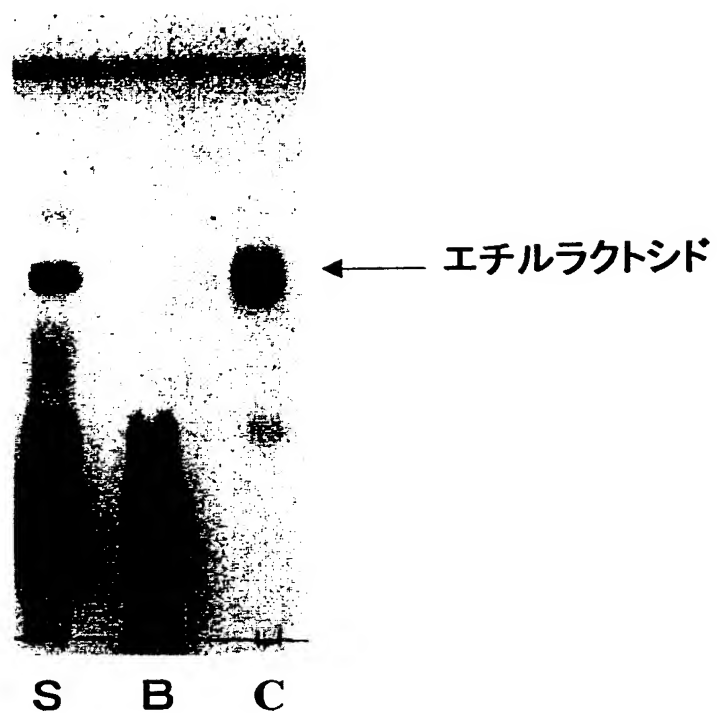
【図 6】



【図7】



【图 8】

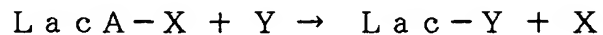


【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 食品、機能性食品素材、医薬品および試薬として有用なラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体を、高収率で、かつ、安価に供給する。

【解決手段】  $\beta$  1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



（式中、LacAはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素（H）、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性またはフェノール性水酸基を有する化合物、もしくは水酸基を有するフラボノイド類縁化合物をそれぞれ表す。）で表わされるラクトース転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000187079]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区内神田2丁目2番1号
氏 名	昭和産業株式会社

